

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

***Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* TOXIGÉNICOS EN
MUESTRAS CLÍNICAS DE LA PROVINCIA DE PIURA, 2017.**

Presentada por:

Br. ITALO LEONARDO GALLES ESPINOZA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

Línea de investigación:

Salud Pública.

Piura – Perú

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

*“Vibrio cholerae y Vibrio parahaemolyticus toxigénicos en muestras clínicas
de la provincia de Piura, 2017”*

Línea de investigación:

Salud Pública



Moblgo. César Augusto Torres Díaz, M.Sc.

Presidente



Moblgo. Jaime N. Fernández Ponce, M.Sc.

Secretario



Dr. Carlos Enrique Holguin Mauricci

Vocal


DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **ITALO LEONARDO GALLES ESPINOZA**, identificado con DNI N° **47231113**, Bachiller de Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **Calle Amazonas #811** del Distrito **CASTILLA**, Provincia **PIURA**, Departamento **PIURA**. Celular: **958691891**. Email: **leo.gallesi27@gmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el Extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 27 de Mayo del 2019



ITALO LEONARDO GALLES ESPINOZA
DNI N° 47231113

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-2016- SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

*“Vibrio cholerae y Vibrio parahaemolyticus toxigénicos en muestras clínicas
de la provincia de Piura, 2017”*

Línea de investigación:

Salud Pública

Asesor:



Mcblga. María Dorothy Torres de León, M.Sc.

Co-asesor:



Dr. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez Blgo.

Tesista:



Br. Italo Leonardo Gallesi Espinoza



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 035-2018-D-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "**VIBRIO CHOLERAE Y VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS TOXIGÉNICOS EN MUESTRAS CLÍNICAS DE LA PROVINCIA DE PIURA, 2017.**" presentado por el señor Bachiller **ITALO LEONARDO GALLES ESPINOZA**, con el asesoramiento de la **McbIgo. María Dorothy Torres Gallo, MSc.** y Co-Asesor **Dr. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez, Blgo.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADO (X)

DESAPROBADO ()

Con la mención de:

..... MUY BUENO


(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

(X) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 25 de junio 2018.


MSc. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


McBlgo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS


Dr. CARLOS ENRIQUE HOLGUÍN MAURICCI
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

Dedicatoria:

*A mi familia, por siempre creer en mí y
haber luchado a mi lado hasta el final.*

*A mi Padre y a tía Bertita, por
enseñarme con el ejemplo que siempre
hay que luchar y hacer sacrificios para
alcanzar los deseos del corazón.*

El trabajo de investigación: “*Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos en muestras clínicas de la provincia de Piura, 2017” fue financiado y ejecutado bajo el proyecto de investigación “Impacto del evento El Niño en la Estacionalidad de las Enfermedades Diarreicas causadas por especies Patógenas de *Vibrio* en Perú” (OGITT: OI-0037-17), financiado por Cienciactiva/FONDECYT (Convenio 145-2017-FONDECYT) y el Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.

Instituciones colaboradoras:

Dirección de Laboratorios de Salud Pública-Piura (MEMO N°2909-2016/DRSP-OEGDREH). Dirección Ejecutiva de Salud Ambiental – Piura (MEMO N°2909-2016/DRSP-OEGDREH). Instituto del Mar del Perú, Lima (Carta N° 258-2017-IMARPE/OGA).

Agradecimientos:

El desarrollo de esta tesis se logró gracias al apoyo, enseñanzas, esfuerzos y dedicación de tiempo de personas e instituciones que confiaron y que brindaron las facilidades para la conclusión satisfactoria de este trabajo de investigación, agradeciendo así:

Al Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Enteropatógenos, por el apoyo en la ejecución de este proyecto.

Al Dr. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez Blgo., coordinador del Laboratorio de Enteropatógenos, por darme la oportunidad y la confianza para desenvolverme e iniciar mi camino en el amplio mundo de la investigación científica.

Al Téc. Gustavo Bellido, por apoyarme y asesorarme en el análisis microbiológico, por brindarme su amistad e incentivar me a finalizar satisfactoriamente este proyecto.

Al Dr. Oscar Escalante, por confiar en mis capacidades y brindarme su apoyo en el área de biología molecular.

A la Blga. France E. Vences Rosales, por su ayuda y consejos en todo momento.

Al Blgo. Eduardo Juscamayta López, por su asesoramiento en el uso de técnicas y estandarización de protocolos moleculares.

A la Mcblga. Dorothy Torres de León M.Sc., por enseñarme a siempre indagar y ser perseverante en la investigación.

Al Hospital Reátegui Delgado, Hospital Cayetano Heredia y Hospital Sata Rosa, por darme las facilidades para recolectar las muestras clínicas.

A la Dirección de laboratorios de Salud Pública, Piura (LARESA) por brindarme las facilidades y el apoyo para realizar el análisis microbiológico de las muestras clínicas.

A mis padres, por el sacrificio, el esfuerzo y la perseverancia de darles a sus hijos la oportunidad de poder alcanzar sus metas y sueños.

A mis tíos Martin, Ana, Manolo, Bremer, por todo el apoyo que me han dado a lo largo de toda mi carrera.

A Br. Judith Matorel, por confiar y creer en mí en todo este tiempo, por ser mi apoyo incondicional y ayudarme a alcanzar mis metas.

A Blgo. Julio Cesar Chunga Espinoza, por ser un buen “compañero” y un buen amigo.

A la familia Sandoval Huánuco, por bríndame un hogar y aceptarme como un miembro más de la familia.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁG.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
2.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS.....	6
2.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	6
2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	6
2.3.1. AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO.....	6
2.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	7
2.3.2.1. Cepas aisladas de cultivo microbiológico.....	7
2.3.2.2. Cepas aisladas directa de heces.....	7
2.3.3. PRUEBA DE PCR.....	8
2.3.3.1. PCR convencional de ADN extraído de cepas.....	8
2.3.3.2. PCR convencional de ADN extraído directo de heces.....	8
2.3.3.3. PCR tiempo real de ADN extraído directo de heces.....	8
2.3.4. ELECTROFORESIS.....	8
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	9
III. RESULTADOS.....	10
3.1. ANALISIS MICROBIOLOGICO Y CARACTERIZACION MOLECULAR...	10
3.2. DETERMINACION DE <i>Vibrio cholerae</i> Y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> TOXIGÉNICOS EN ADN DIRECTO DE HECES.....	11
IV. DISCUSIÓN.....	13
V. CONCLUSIONES.....	16
VI. RECOMENDACIONES.....	17
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
VIII. ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	PÁG.
Cuadro 1. - Información epidemiológica y caracterización molecular de las cepas clínicas de <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> procedentes de la provincia de Piura, marzo – mayo del 2017.	10
Cuadro 2. - Determinación y caracterización molecular de <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> empleando ADN extraído directo de heces.....	11
Cuadro 3. - Cuadro de comparación de muestras positivas para el gen <i>tdh</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> entre la prueba de PCR convencional y PCR tiempo real.....	12

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁG.
Figura 1: Curvas de amplificación del gen <i>tdh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i> por PCR en tiempo real de ADN extraído directo de heces.....	12
Figura 13.1: (a) Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen <i>ompW</i> (304pb) de <i>V. cholerae</i> de ADN extraído de cepas. (b) Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen <i>stn/sto</i> (216pb) de <i>V. cholerae</i> de ADN extraído de cepas.....	37
Figura 13.2: Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen <i>tdh</i> (252pb) de <i>V. parahaemolyticus</i> de ADN extraído directo de heces....	37
Figura 14.1: Fechas de recolección de muestras positivas para el gen <i>tdh</i> de <i>V. parahaemolyticus</i> por cada hospital.....	38
Figura 14.2: Temperatura y precipitación durante enero – mayo 2017, máxima temperatura superficial del mar, Mínima temperatura superficial del mar, promedio de temperaturas superficiales del mar, valor de precipitación.....	38
Figura 14.3: Medios TCBS, CHROMagar Vibrio 1% NaCl y agar SS.....	39
Figura 14.4, 14.5 y 14.6: Muestras de heces recolectadas de los centros de salud de Piura.....	39
Figura 14.7: Enriquecimiento de las muestras de heces en APA 1% NaCl.....	39
Figura 14.8: Muestras de heces conservadas en ARN ^{later}	39

ÍNDICE DE ANEXOS

CONTENIDO	PÁG.
1. Criterios de inclusión para muestras clínicas de la vigilancia molecular de <i>vibrio cholerae</i> y <i>vibrio parahaemolyticus</i> en la costa peruana en el periodo 2016 - 2017, Instituto Nacional de Salud.....	23
2. Extracción de ADN con DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN).....	24
3. Protocolo de extracción/purificación de DNA total a partir de heces conservadas en <i>RNAlater</i> para la detección de <i>vibrio spp.</i> (modificación del kit qiaamp® fast DNA stool mini- QIAGEN).....	25
4. Protocolos de PCR para el gen <i>ToxR</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	27
5. Protocolos de PCR para el gen <i>tdh</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
6. Protocolos de PCR para el gen <i>trh</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	29
7. Protocolos de PCR para el gen <i>OmpW</i> de <i>Vibrio cholerae</i>	30
8. Protocolos de PCR para el gen <i>ctxA</i> de <i>Vibrio cholerae</i>	31
9. Protocolo <i>V. parahaemolyticus</i> <i>tdh-trh</i> multiplex PCR tiempo real.....	32
10. Protocolo <i>V. cholerae</i> <i>ctxA</i> multiplex PCR tiempo real.....	34
11. Formulas para hallar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Continuación...

CONTENIDO	PÁG.
12. Lista de primes y sondas para protocolos de PCR tiempo real y PCR convencional.....	36
13. Electroforesis en gel de agarosa de genes evaluados en <i>V. cholerae</i> y <i>V. parahaemolyticus</i>	37
14. Figuras.....	38

Resumen

Vibrio cholerae y *Vibrio parahaemolyticus* son bacterias gramnegativas implicadas en salud pública, por lo cual el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos en muestras clínicas de la provincia de Piura entre los meses de marzo a mayo del 2017. Se colectaron muestras de heces de pacientes con enfermedad diarreica aguda (EDA), atendidos en cuatro establecimientos de salud de Piura. A partir de las muestras se realizaron cultivos microbiológicos utilizando medios selectivos tales como CHROMagar Vibrio y agar TCBS. Las colonias sospechosas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y confirmadas por PCR. Paralelamente, se realizó la extracción de ADN a partir de heces para detectar directamente la presencia de marcadores moleculares de toxina *ctxA* de *Vibrio cholerae* y *tdh*, *trh* de *Vibrio parahaemolyticus*. Se obtuvo un total de doscientos cincuenta muestras colectadas del Hospital III José Cayetano Heredia, Hospital II Jorge Reátegui Delgado, Hospital II Santa Rosa y CESAMICA. Por cultivo microbiológico se obtuvieron 2 cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, sin embargo, solo una de las dos cepas fue positiva al gen *tdh* (0,4%) y se obtuvieron tres cepas de *Vibrio cholera* No-O1 / No-O139 sin toxina (1,2%). Por otro lado, se analizó el ADN directo de las heces, obteniendo siete muestras positivas para la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* con el gen *tdh* (2,8%) mediante PCR convencional, mientras que diez muestras fueron positivas por PCR en tiempo real y no se detectaron muestras positivas para el gen *ctxA* de *Vibrio cholerae*. En este estudio la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en la provincia de Piura coincidió con la estación de verano del 2017, asimismo el empleo de las técnicas moleculares como PCR y sus variantes resultan útiles en la detección oportuna de este patógenos.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, vibrios toxigénicos, muestras clínicas.

Abstract

Vibrio cholerae and *Vibrio parahaemolyticus* are gram-negative bacteria involved in public health, therefore, aim of this study was to determine the presence of toxigenic *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in clinical samples from the province of Piura between the months of march to may 2017. Stool samples from patients with acute diarrheal disease (ADD) were collected from four health center in Piura. Samples were analyzed through microbiological cultures using media selectives such us CHROMagar *Vibrio* and TCBS agar. Suspicious strains were characterized by biochemical tests and confirmed by PCR. In parallel, the extraction of DNA from stool was performed to directly detect the presence of molecular markers of *ctxA* toxin from *Vibrio cholerae* and *tdh*, *trh* from *Vibrio parahaemolyticus*. A total of two hundred and fifty samples were collected from Hospital III José Cayetano Heredia, Hospital II Jorge Reátegui Delgado, Hospital II Santa Rosa and CESAMICA, however, only one of the two strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated was positive to the *tdh* gene (0.4%) and three strains of *Vibrio cholera* No-O1 / No-O139 without toxin (1.2%) were obtained. On the other hand, the direct DNA of the stools was analyzed, obtaining seven positive samples for the presence of *Vibrio parahaemolyticus* with the *tdh* gene (2.8%) by means of conventional PCR, while ten samples were positive by real-time PCR and not positive samples were detected for the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae*. In this study the presence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* in the province of Piura coincided with the summer season of 2017 and the use of molecular techniques such as PCR and its variants are useful in the timely detection of this pathogen.

Key words: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, toxigenic vibrios, samples clinics

I. INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Vibrio* habitan naturalmente en ambientes acuáticos; sin embargo, existen algunos variantes que son considerados patógenos facultativos (Reidl y Klose, 2002); Thompson *et al.*, 2004). Los vibrios son bacterias gramnegativas, aerobias y anaerobias facultativas, que pueden presentar una morfología curvada, generalmente halodependientes, poseen catalasa, oxidasa, nitratorreductasa y triptofanodesaminasa y fermentan la glucosa. Este género presenta un antígeno flagelar H y uno somático O, que han sido ampliamente utilizados para la tipificación de los vibrios (Organización Mundial de la Salud, 2005).

Actualmente se conocen 138 especies dentro del género *Vibrio* (LPSN, 2017), de las cuales 12 son consideradas patógenas para el ser humano (Heitmann *et al.*, 2005). Las especies patógenas de *Vibrio* son *V. mimicus*, *Grimontia (Vibrio) hollisae*, *V. fluviales*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, *Photobacterium (Vibrio) damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis*, *V. harveyi*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* (Cantet *et al.*, 2013). De ésta lista los responsables del mayor número de las enfermedades causadas por este género son *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio cholerae*, los cuales son implicados en un alto número de enfermedades transmitidas por alimentos. Los vibrios son sensibles a pH bajos y su crecimiento es óptimo en pH altos, por lo que las infecciones causadas por éstos vibrios son frecuentemente asociadas con alimentos poco ácidos. Estas infecciones son provocadas por el consumo de agua, marisco o pescado crudo (OMS y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2001; Nair, 2007).

Los vibrios se asocian a infecciones del tracto gastrointestinal siendo necesaria la ingestión de aproximadamente 1×10^4 bacterias por gramo de marisco y se necesita un mayor inóculo para desarrollar síntomas cuando la infección se trasmite por el agua (Hernández *et al.*, 2005). También se ha descrito su implicación en patologías extraintestinales causando bacteriemia, otitis, conjuntivitis e infecciones de tejidos blandos, entre otras (OMS y FAO, 2001; Morris, 2003).

V. cholerae es el agente del cólera humano. Originalmente fue aislado por R. Koch en 1884 a partir de enfermos de cólera en Egipto, y ha sido responsable de epidemias y pandemias en todas las épocas, especialmente en Grecia, China y la India. En 1817 se produjo la primera pandemia de cólera fuera de Asia y desde entonces se han producido siete nuevas pandemias. La última se inició en Indonesia en 1961 y desde allí se propagó a África (1970) y América Latina (1991), extendiéndose después a los Estados Unidos (Maguiña, 2010).

En la actualidad se reconocen alrededor de 200 serogrupos de *V. cholerae* sobre la base de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y sólo dos, los serogrupos O1 y O139, se consideran responsables de epidemias de cólera. Actualmente estos dos serogrupos son los únicos que causan los síntomas de cólera clásicos, en los que una fracción de los enfermos padece diarrea acuosa grave y fulminante, debido a que son los únicos capaces de producir toxina colérica (TC). Dentro del serogrupo O1, se incluyen dos biotipos: Clásico y El Tor. Dentro de los biotipos Clásico y El Tor, se integran tres serotipos diferentes: Inawa, Ogawa e Hikojima. Se considera que el biotipo clásico fue responsable de las seis primeras pandemias de cólera, mientras que el biotipo El Tor es el causante de la séptima pandemia, que comenzó en 1961. El resto de serogrupos se reconocen como no O1/no O139, pudiendo aislarse de fuentes ambientales produciendo esporádicamente casos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales (OMS, 2002).

Las cepas de *V. cholerae* O1 y O139 que causan el cólera producen una enterotoxina (la toxina del cólera) que altera los flujos de iones a través de la mucosa intestinal, ocasionando una pérdida considerable de agua y electrolitos en las heces líquidas de tono blanquecino con pequeños gránulos (con aspecto de «agua de arroz») y restos de mucosa. La manifestación sintomática de la enfermedad puede ser leve, moderada o grave, debido a que el enfermo puede perder hasta 10 o 15 litros de líquido al día. El 60% de los enfermos que no reciben tratamiento mueren, pero la letalidad se puede disminuir hasta menos del 1% con tratamiento (OMS, 2002).

La toxina colérica es una toxina tipo A-B, formada por una unidad A y cinco B que le sirven de soporte. Una vez que estas últimas se unen a los receptores GM1 de la superficie celular se produce un cambio conformacional en la molécula que permite la separación y entrada de la subunidad A al interior celular. En el interior, la subunidad A se disocia en

dos fragmentos A1 y A2 y el primero produce la hidrólisis del NAD liberando ADP-ribosa que se fija covalentemente e inactiva la proteína G y, como consecuencia, activa la adenilato ciclasa. El resultado es el incremento del AMP cíclico intracelular, que da lugar a la liberación de electrolitos y comienzo de la diarrea típica (Namdari *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2003).

En las cepas patógenas de *Vibrio cholerae*, además de los genes que codifican para la toxina colérica (*ctxA*, *ctxB*) están también presentes genes que codifican para un factor de colonización denominado *TCP* (toxina relacionada con el *pilus*) y la proteína reguladora *ToxR* que regula la expresión de ambos (Mehrabadi *et al.*, 2012, Nandi *et al.*, 2000a; Nandi *et al.*, 2000b).

En 1991, se aisló por primera vez la cepa de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 Biovar el Tor Serovar Inaba a partir de muestras clínicas, confirmando la epidemia de Cólera en Perú. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Enteropatógenos (LANARE), del Instituto Nacional de Salud (Perú); las primeras muestras fueron remitidas de las Ciudades de Chancay y Chimbote, y otras regiones norteñas como Piura. Las muestras fueron obtenidas por hisopado rectal y sometidas a múltiples pruebas bioquímicas para su determinación. Para la identificación serológica se utilizó sueros inmunes polivalente O1 y monoespecíficos Inaba y Ogawa. Las muestras procedentes de Piura y Lima fueron enviados para su confirmación al Centers for Disease Control (CDC) en Atlanta, Estados Unidos (Bravo y Guillén, 2011).

En el año 2004 *Vibrio cholerae* O1 se presenta otra vez en América Latina; esta vez en Colombia, entre los meses de julio y agosto, con tres casos en el departamento de Nariño, al sur de Colombia en la frontera con el Ecuador. Los tres aislamientos fueron confirmados como *Vibrio cholerae* O1, El Tor, serotipo Ogawa. En el mismo año el Laboratorio de Enteropatógenos del Centro Nacional de Salud Pública recibió una cepa enviada por el Laboratorio de Referencia DISA II Lima Sur, de una paciente de 15 años con un cuadro clínico de diarrea acuosa. En el coprocultivo realizado se obtuvo un aislamiento compatible con *Vibrio cholerae*. En el Instituto Nacional de Salud se confirmó el aislamiento e identificó como serogrupo O139. La prueba de PCR indicó que no era portadora del gen codificante de la toxina (gen CTX), causante de las manifestaciones clínicas de Cólera (Huapaya *et al.*, 2005).

Consecuencia de los cambios climáticos generados por el calentamiento global, hay evidencia del surgimiento de una nueva especie del género *Vibrio*, presentándose casos de gastroenteritis reemergentes en diferentes partes del mundo producidos por *Vibrio parahaemolyticus* (Hernández, 2005).

Vibrio parahaemolyticus fue identificado por primera vez como agente de enfermedad transmitida por alimentos en Japón en el año 1950, en relación a un brote asociado al consumo de sardinas. Desde entonces, se ha identificado como causa frecuente de síndrome diarreico agudo en países desarrollados y en vías de desarrollo (Daniels *et al.*, 2000).

En febrero de 1996, epidemias de gastroenteritis aguda causadas por *Vibrio parahaemolyticus* del serogrupo O3:K6 fueron reportadas inicialmente en Calcuta, India y posteriormente en tres continentes: África, Europa y América. Esta era la primera vez que un serogrupo de *V. parahaemolyticus* de los más de 71 existentes, mostraba potencial pandémico, produciendo epidemias de diarrea aguda acuosa que rápidamente se diseminaron sin respetar fronteras, contrario al patrón local restringido que se les conocía hasta esa época. Posteriormente, otros serotipos con características genéticas similares al clon pandémico han causado epidemias globalmente. Dos características son notables en estas cepas pandémicas: desplazan rápidamente a cepas pre-existentes en el ecosistema marino, y causan diarrea severa (Nair *et al.*, 2007).

Vibrio parahaemolyticus es responsable de brotes de gastroenteritis, con un espectro que varía desde deposiciones acuosas leves hasta disentéricas por ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos. Ocasionalmente se ha descrito asociado a infección de heridas y sepsis. El riesgo de infecciones sistémicas graves y muerte por esta bacteria es mayor en edades extremas, pacientes inmunocomprometidos y con patología de base. Los síntomas asociados al cuadro gastrointestinal incluyen dolor abdominal tipo cólico, náuseas, vómitos, fiebre y escalofríos. El período de incubación es, en promedio, de 17 horas (rango de 4 a 90 horas) con una media de duración de los síntomas de 2 a 3 días, pudiendo prolongarse hasta 10 días (Daniels *et al.*, 2000; Heitmann *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005; Neill y Carpenter, 2005).

Como factor de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus* destaca la hemolisina o toxina termoestable directa (*thermostable direct hemolysin-TDH*), producida por aproximadamente 95% de las cepas toxigénicas y responsable de la producción de diarrea. El mecanismo descrito es la alteración del flujo iónico en las células intestinales, lo que desencadena una diarrea secretora. Otros factores importantes son la hemolisina relacionada con *TDH* (*TRH*), pili, hemaglutininas (hemaglutinina sensible a la manosa), factores de colonización y la capacidad de invasión celular (Heitmann *et al.*, 2005; Hall y Woods, 2006).

En Perú, el primer reporte de caso de *V. parahaemolyticus* fue hecho en Trujillo, pero el primer brote fue detectado en Lima. Una comparación de características clínicas entre cepas pandémicas y no pandémicas de *V. parahaemolyticus* en Perú mostró que las cepas pandémicas eran más frecuentes entre jóvenes menores de 30 años y causaban más deshidratación moderada-severa (Gil *et al.*, 2007).

Durante los meses de febrero y marzo del 2009 se reportó un brote de *Vibrio parahaemolyticus* en Perú, el cual se generó en el norte del país (Piura, Cajamarca y Lambayeque) y llegó hasta la ciudad de Lima. En este brote se obtuvieron 30 aislados de muestras clínicas de pacientes con sintomatología de gastroenteritis. El análisis de las cepas mostró que presentaban el gen de toxigenicidad *tdh*, pero carecían del gen *trh*, además en la serotipificación se determinó que estas cepas pertenecían al serotipo O3:K59 y la electroforesis en gel de campo pulsado mostró que todas las cepas compartieron un patrón indistinguible (González *et al.*, 2016).

Los métodos convencionales para la identificación y tipificación de patógenos microbianos están basados en el uso de métodos fenotípicos los cuales consisten en procedimientos largos y laboriosos (Makino *et al.*, 2003). Actualmente, con la entrada a la era de la genómica, existen diversos métodos de genotipado que ofrecen alternativas rápidas y efectivas para la detección de estos patógenos, tales como los métodos basados en PCR (Escalante *et al.*, 2015).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS:

Las muestras fueron obtenidas de cuatro establecimientos de salud de la provincia de Piura: Hospital III José Cayetano Heredia, Hospital II Jorge Reátegui Delgado, Hospital II Santa Rosa y El centro de salud CESAMICA, durante marzo, abril y mayo del 2017.

2.2. SELECCIÓN DE MUESTRAS:

Se recolectaron muestras clínicas diarreicas, obtenidas en los respectivos laboratorios de los establecimientos de salud, tomando en cuenta los criterios de inclusión para muestras clínicas de la Vigilancia Molecular de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en la costa peruana en el periodo 2016 – 2017 por el Instituto Nacional de Salud (Ver Anexo 1). También se evaluó el color (blanquecinas, amarillas, marrones, verdes y rojas) y la consistencia de las muestras (semilíquidas o líquidas). Todas las muestras fueron transportadas en una caja isotérmica con gel refrigerante (Aproximadamente 4°C) al Laboratorio de Microbiología del Laboratorio Referencial de Salud (LARESA) Piura.

2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

2.3.1. Aislamiento microbiológico:

Las muestras de heces fueron homogenizadas manualmente con movimientos suaves de arriba hacia abajo dentro de sus respectivos recipientes, luego se introdujo dentro del recipiente un hisopo y se tomó aproximadamente 0.5g de muestra, se suspendió en 7ml de Agua Peptonada Alcalina (APA) suplementada con NaCl (1g NaCl/100ml APA), la suspensión se incubó a 37°C por 6 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se tomó parte de la película que se formó en el enriquecido y se sembró por agotamiento en estrías en placas de agar Tiosulfato citrato bilis sacarosa

(TCBS), incubándolas a 37°C por 16 horas, se seleccionaron colonias de color amarillo (presuntivas de *Vibrio cholerae*) y las colonias de color verde (presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus*), y se sembraron en CHROMagar-Vibrio incubándolas a las condiciones antes mencionadas. De la placa de CHROMagar-Vibrio se tomaron las colonias de color turquesa (presuntivas de *Vibrio cholerae*) y las colonias de color púrpura (presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus*) y se sembraron en crioviales que contenían agar TSA 1% NaCl para su transporte al Laboratorio de referencia Nacional de Enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud Lima. Paralelamente, con un hisopo se tomó 0.5g de la muestra recolectada y se colocó dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5ml con 0.8ml de ARNlater para su posterior análisis molecular en el Instituto Nacional de Salud Lima.

2.3.2. Extracción de ADN:

2.3.2.1. Cepas aisladas de cultivo microbiológico:

Las cepas remitidas fueron nuevamente suspendidas en APA 1% NaCl incubando a 37°C por 6 horas, luego se sembró en CHROMagar Vibrio incubándolas a la misma temperatura por 16 horas. Luego de transcurrido el tiempo de incubación las colonias presuntivas se sembraron en TSA 1% NaCl y se incubaron a 37°C por 16 horas. Una vez obtenido el crecimiento de las cepas en TSA 1% NaCl, se sembraron en caldo Luria Bertani por 3 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a aplicar el protocolo de extracción de DNeasy® Blood & Tissue kit (Ver Anexo 2).

2.3.2.2. ADN directo de heces:

Se tomaron los viales de microcentrifuga de 1.5 ml que contenían los hisopos con las muestras de heces sumergidas en ARNlater, se retiró el hisopo tratando de dejar la mayor cantidad de muestra dentro del vial con ARNlater. Una vez obtenidos los viales con la muestra suspendida en el ARNlater se procedió a aplicar el protocolo de extracción de ADN

directo de heces (Ver Anexo 3) estandarizado en el laboratorio de enteropatógenos del Instituto Nacional de Salud Lima.

2.3.3. Prueba de PCR:

2.3.3.1. PCR convencional de ADN extraído de cepas:

Se empleó la enzima Kappa taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) junto con los protocolos de PCR convencional para los genes *ToxR*, *tdh* y *trh* de *Vibrio parahaemolyticus* (Ver Anexos 4, 5 y 6), y los protocolos de PCR convencional para los genes *ompW*, *stn/sto* y *ctxA* de *Vibrio cholerae* (Ver Anexos 7 y 8).

2.3.3.2. PCR convencional de ADN extraído directo de heces:

Se empleó la enzima Kappa taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) junto con los protocolos de PCR convencional para los genes *ToxR*, *tdh* y *trh* de *Vibrio parahaemolyticus* (Ver Anexos 4, 5 y 6), y los protocolos de PCR convencional para los genes *ompW*, *stn/sto* y *ctxA* de *Vibrio cholerae* (Ver Anexos 7 y 8).

2.3.3.3. PCR Tiempo Real de ADN extraído directo de heces:

Se empleó la enzima Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) junto con los protocolos de PCR Tiempo Real para los genes *tdh* y *trh* de *Vibrio parahaemolyticus* (Ver Anexo 9), y el protocolo de PCR Tiempo Real para el genes *ctxA* de *Vibrio cholerae* (Ver Anexo 10).

2.3.4. Electroforesis:

El gel de electroforesis se preparó al 1.5% de agarosa, pesando 1.5 gr de agarosa y adicionándole 100ml de TAE 1X. Adicionalmente se le agregó a la mezcla 7 ul de Syber (Invitrogen), como solución de revelado. Las

condiciones que se usaron para la corrida electroforética fueron 100 voltios a 400 amperios por 25 minutos.

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo (Ver Anexo 11) de la prueba de PCR en tiempo real frente a los resultados de la prueba de PCR convencional fue determinado mediante un cuadro de doble entra con intervalo de confianza de 95%.

III. RESULTADOS

3.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR:

Se recolectaron un total de 250 muestras entre los meses de marzo (n=45), abril (n=131) y mayo (n=74), procedentes del Hospital III José Cayetano Heredia (n=82), Hospital II Jorge Reátegui Delgado (n=127), Hospital II Santa Rosa (n=36) y CESAMICA (n=5).

Del total de muestras, dos de ellas procedentes del Hospital III José Cayetano Heredia (HJCH) y dos del Hospital II Jorge Reátegui Delgado (HJRD) mostraron mediante cultivo microbiológico la presencia de vibrios. Se obtuvieron dos muestras positiva para *V. cholerae*, una muestra positiva para *V. parahaemolyticus* y una muestra positiva para ambos patógenos. La evaluación de los genes de las cepas resultantes mostró que, una de las dos cepas de *V. parahaemolyticus* presentó únicamente el gen *tdh*, mientras que, las cepas aisladas de *V. cholerae* carecieron del gen de la toxina colérica (*ctxA*) y del factor de virulencia *stn/sto* (Cuadro 1, Ver Anexo 13).

Cuadro 1.- Información epidemiológica y caracterización molecular de las cepas clínicas de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* procedentes de la provincia de Piura, marzo – mayo del 2017.

Establecimiento de salud	Fecha	Sexo	Edad (Años)	Vibrio	Genes de toxigenicidad
HJCH	6/03/2017	M	42	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>
HJRD	11/03/2017	F	2	<i>V. cholerae</i> / <i>V. parahaemolyticus</i>	---
HJRD	11/03/2017	M	3	<i>V. cholerae</i>	---
HJCH	21/03/2017	F	80	<i>V. cholerae</i>	---

3.2. DETECCIÓN DE *Vibrio cholerae* Y *Vibrio parahaemolyticus* TOXIGÉNICOS EN ADN DIRECTO DE HECES:

La evaluación de la presencia de *V. cholerae* toxigénico (*ctxA*) fue negativa para todas las muestras tanto en PCR convencional como en PCR tiempo real. Por otro lado la evaluación de *V. parahaemolyticus* toxigénico en ADN directo de heces reveló que 7 (2.8%) de ellas presentaron el gen *tdh* por medio de la prueba de PCR convencional (Ver anexo 13), en contraste a las 10 muestras (4%) positivas para el mismo gen mediante PCR tiempo real (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Determinación y caracterización molecular de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* empleando ADN extraído directo de heces.

	<u><i>Vibrio cholerae</i></u>	<u><i>Vibrio parahaemolyticus</i></u>	
PCR convencional	0	7	
PCR tiempo real	0	10	
	<u>Genes de toxigenicidad evaluados</u>		
	<u><i>ctxA</i></u>	<u><i>tdh</i></u>	<u><i>trh</i></u>
PCR convencional	0	7	0
PCR tiempo real	0	10	0

Dentro de las 10 muestras positivas para el gen *tdh* de *V. parahaemolyticus* obtenidas por PCR en tiempo real se observó que 7 de ella mostraron una curva de amplificación similar a la del patrón y 3 por debajo del mismo, sin embargo todas las muestras presentaron curvas de amplificaron dentro del rango de ocho y diecisiete ciclos. Los valores de extracción de ADN que presentaron en promedio las muestras fue de 63.27 ng/ul (Figura 1).

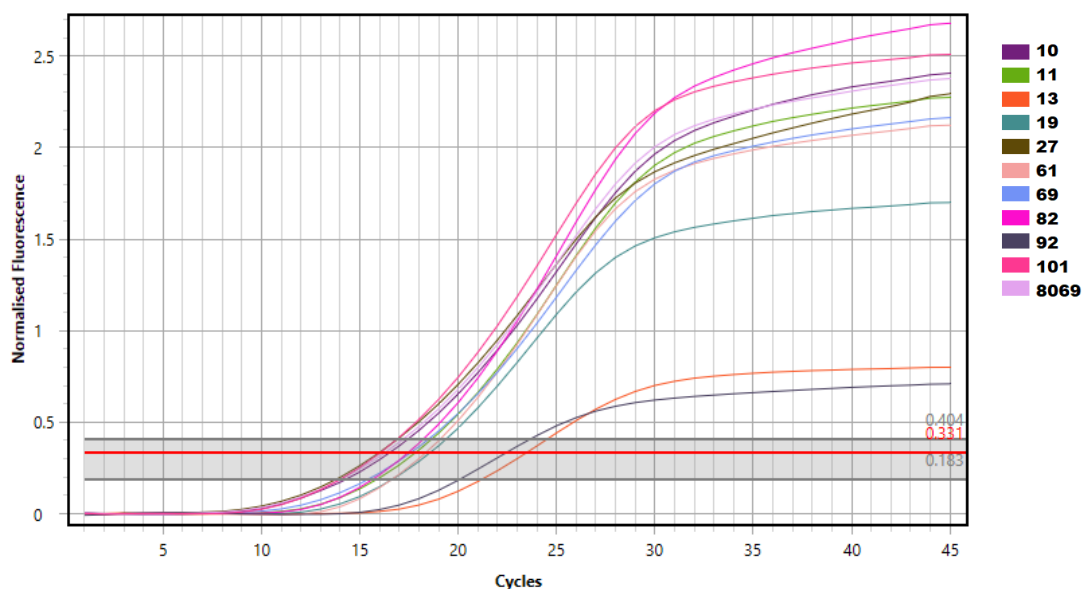


Figura 1: Curvas de amplificación del gen *tdh* de *V. parahaemolyticus* por PCR en tiempo real de ADN extraído directo de heces.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos por la prueba de PCR en tiempo real, en comparación con la prueba de PCR convencional (Prueba estándar) (Cuadro 3), se encontró que dentro de un intervalo de confianza del 95% para cada parámetro analizado, la sensibilidad fue del 100%, la especificidad fue del 98.77%, el valor predictivo positivo (VPP) fue del 70%, el valor predictivo negativo (VPN) fue del 100% y la prevalencia fue de un 4% en base al total de muestras evaluadas.

Cuadro 3.- Cuadro de comparación de muestras positivas para el gen *tdh* de *Vibrio*

parahaemolyticus entre la prueba de PCR convencional y PCR tiempo real.

<u>qPCR</u>	<u>cPCR</u>		<u>TOTAL</u>
	(+)	(-)	
(+)	7	3	10
(-)	0	240	240
TOTAL	7	243	250

* cPCR: PCR convencional, qPCR: PCR en tiempo real

V. DISCUSIÓN

Ordoñez (2017) reporta que el departamento de Piura presento el mayor aumento de episodios de EDA (15,3%) en Perú, aunque las etiologías de estos casos no están bien definidas, debido a que dentro de los análisis rutinarios de muestras clínicas de heces de los centros de salud de este departamento no se evalúa la presencia de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*, generando así un déficit en el manejo de la información. Dentro del presente estudio, el análisis físico de las muestras clínicas que fueron positivas para *V. parahaemolyticus* con presencia del gen *tdh* mostraron que el 90% de muestras tenían consistencia líquida, el 80% presento coloración marrón y en todas las muestras hubo ausencia de moco y sangre. Estas características físicas son contrarias a las observadas por Daniels et al (2000) y Butt et al (2004), ya que ellos reportan que la enfermedad producida por *V. parahaemolyticus* es una diarrea aguda, generalmente de tipo secretorio y que en algunas ocasiones puede ser hemorrágica. Estas pequeñas contradicciones en el análisis físico pueden generar una parcialización errónea de muestras, y por ende, una mala determinación de los patógenos dentro de las muestras clínicas. Las pruebas moleculares nos brindan una disminución considerable del tiempo de determinación de los patógenos, sin afectar la fidelidad y confiabilidad de los resultados, y al emplearlos, nos evitan de hacer separación de muestras con la finalidad de reducir los tiempos de trabajo. La implementación y utilización de protocolos de PCR en tiempo real para la determinación de patógenos con presencia de genes de toxigenicidad directamente de muestras clínicas, es muy recomendable, ya que la sensibilidad y especificidad de este ensayo es muy alta y confiable.

Los meses cálidos en los que se colectaron las muestras fueron afectados por la presencia de “El niño costero”, fenómeno que se caracterizó por generar un calentamiento local de las masas de agua marina en los países de Perú y Ecuador. Este calentamiento anómalo de las masas de agua marina, podría estar relacionado con la presencia *V. parahaemolyticus* toxigénicos en la región de Piura, ya que este patógeno tiene afinidad por las aguas cálidas, debido a esta afinidad, es que durante el año de 1995 en Perú empezó a incrementarse la presencia de este patógeno entre los meses de enero, febrero y marzo donde la temperatura por estos meses se elevó de una forma considerable (Confirmación de casos, 1998). La incidencia del patógeno disminuyó en abril de ese año, aunque aún tuvo un carácter significativo. De igual forma sucedió en el verano de 1996 observándose

la presencia de casos de *Vibrio parahaemolyticus* en los meses de enero, febrero, y marzo (Confirmación de casos, 1998).

El análisis de los datos reveló que una muestra dentro de los resultados positivos para *V. parahaemolyticus* toxigénicos pertenecía a un infante de dos años de edad; teniendo en cuenta que la transmisión de *V. parahaemolyticus* es generalmente por el consumo de alimentos de origen marino, siendo los mariscos, especialmente los moluscos bivalvos, los que acumulan cantidades importantes del patógeno, y que los crustáceos y pescados no acumulan el vibrión en cantidades importantes para causar infección, pero pueden alcanzar grandes cantidades de éste al dejarse sin adecuada refrigeración por unas pocas horas (Mancilla, 2005), se cree que el infante adquirió el patógeno por la mala manipulación o falta de higiene de los padres al preparar o conservar los alimentos del infante. Olea et al. (2005), explica que la transmisión de este patógeno puede ser mediante la ingestión de mariscos contaminados, pero que también se puede dar por contaminación cruzada de otros alimentos (por la manipulación incorrecta de mariscos crudos) o por malos hábitos de higiene de personas que portan el patógeno. Por su parte Mancilla. (2005), coincide con lo expuesto, planteado que también se puede transmitir el patógeno por contaminación cruzada al ingerir cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos o agua contaminada, y agrega, que el transporte o almacenamiento de productos del mar sin las condiciones adecuadas de refrigeración favorecen la proliferación de la bacteria y, por lo tanto, la posibilidad de infectar.

En la última década, se llegó a secuenciar el genoma de la cepa pandémica toxigénica RIMD2210633 (Makino *et al.* 2003), demostrando que ella presentaba la ausencia, del gen codificante para la hemolisina relacionada con la TDH (*trh*), pero que si presentaba el gen codificante para la TDH. Por su parte Yuansha et al. (2011), realizó el secuenciamiento de cuatro cepas pandémicas, de las cuales tres tenían origen asiático (RIMD2210633 en 1996, la cepa AN5034 en 1998 y la cepa K5030 en 2005), y una de origen peruano (Perú466 en 996), obteniendo como resultado que todas la cepas pandémicas tuvieron la presencia del gen codificante para la hemolisina termoestable directa (*tdh*). En base a esto, la ausencia del gen codificante para la TRH en las muestras clínicas colectadas en la ciudad de Piura puede estar relacionada con la poca difusión y transmisión de este gen entre esta especie bacteriana, contrario a esto observamos que el gen *tdh* se mantiene presente en las cepas toxigénicas ya que las cepas pandémicas y sus

clones presentan una línea marcada en la portabilidad de este gen. Por su parte Dabanch et al. (2009), plantea que como factor de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus*, destaca la hemolisina o toxina termoestable directa (thermostable direct hemolysin-TDH), producida por aproximadamente 95% de las cepas y es el gen responsable de la producción de diarrea, siendo esto acorde con los resultados hallados en la investigación.

Entre los resultados obtenidos, se encontraron tres muestras clínicas que presentaron *Vibrio cholerae* No-O1 y No-O139 con ausencia del gen *ctxA*. Investigaciones anteriores han reportado los serotipos de *Vibrio cholerae* No-O1 y No-O139 en pacientes con síntomas que van desde diarreas leves hasta deshidrataciones graves, es así que Gonzales et al. (2009), expone que entre 1999 y el 2000 en Orán (provincia de Salta), ocurrió un brote de diarreas que afectó a toda la población. De este brote se llegó a aislar *Vibrio cholerae* No-O1 de 10 muestras clínicas. Por su parte Kaper et al. (1995), plantea que estos serotipos son considerados no epidémicos, pero Morris (1994), afirma que los vibrios coléricos no epidémicos tienen potencial para producir diarrea a través de otros mecanismos y toxinas diferentes a la toxina colérica producida por el gen *ctxA*, que pueden ser hemolisinas, enterotoxinas termolábiles o termoestables.

VI. CONCLUSIONES

- 1 Se determinó *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos con presencia del gen *tdh* en muestras clínicas de la provincia de Piura durante los meses de marzo a mayo del año 2017, mediante análisis microbiológico y análisis de ADN extraído directamente de muestra, se confirmó los resultados por PCR convencional (2.8%) y PCR en tiempo real (4%).
- 2 Se determinó la presencia de *Vibrio cholerae* no-O1/no-O139 en un caso de EDA, este aislamiento no presento toxina colérica.
- 3 La sensibilidad de la detección de *Vibrio parahaemolyticus* *tdh* positivo mediante la técnica de PCR en tiempo real, frente al PCR convencional fue de un 100%.

VII. RECOMENDACIONES

- 1 Realizar un monitoreo de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras clínicas, tomando como referencia los centros de salud de Piura y de las ciudades cercanas a zonas costeras.
- 2 Realizar un estudio epidemiológico de las infecciones por *Vibrio* en poblaciones cercanas al litoral de la región Piura.
- 3 Considerar el uso de técnicas moleculares como la PCR tiempo real para la vigilancia de especies de *Vibrio* patógenas en los centros de salud de Piura.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bielawska-Drózd, A., Mirski, T., Bartoszcze, M., Cieslik, P., Roszkowiak, A., Michalski, A. (2012). Development of real-time PCR assay for detection of *Vibrio cholerae*. *Poish Journal of environmental Studies*, 21(2), 279-288.
- Blake, P., Weaver, R., Hollis, D. (1980). Diseases of humans (other than colera) caused by vibrios. *Annual Reviews*, 34, 341-367.
- Bravo, N. y Guillén, A. (2011). Reporte histórico: primer aislamiento de *Vibrio cholera* serogrupo o1 biovar el tor serovar inaba durante la epidemia de cólera en el Perú 1991. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28(1), 136-139.
- Cantet, F., Hervio-Heath, D., Caro, A., Le Menec, C., Monteil, C., Quéméré, C., et al. (2013). Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Research in Microbiology*, 164, 867-874.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Update on Cholera-Haiti, Dominican Republic and Florida. Morbidity and Mortality Weekly Report, 59, 1637-41.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2010). Update: outbreak of cholera-Haiti. Morbidity and Mortality Weekly Report, 59, 1586-1590.
- Chang, W., Pien, F. (1986). Marine-acquired infections. Hazards of the ocean environment. *Postgraduate Medical Journal*, 80, 30-32.
- Confirmación de casos. (1998 Enero-Febrero). Boletín informativo del Instituto Nacional de Salud.
- Dabanch, J., Herrero, D., Pavéz, C., Veas, N., Braun, S. y Porte, L. (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 26 (4), 360-362.
- Daniels, N., Mackinnon, L., Bishop, R., Altekruse, S., Ray, B., Hammond R, et al. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal Infectious Disease*, 181, 1661-1666.

- Escalante, O., Kayali, Y., Yamazaki, W., et al. (2015). Improvement of the quantitation method for the *tdh+* *Vibrio parahaemolyticus* in molluscan shellfish based on most-probable-number, immunomagnetic separation, and loop-mediated isothermal amplification. *Frontiers in Microbiology*, 6, 270.
- Fooladi, A., Marashi, S., Rajabnia, R., Hojati, Z., Moghim, S., Bahram N. (2013). Determination of *ctxAB* expression in *Vibrio cholerae* Classical and El Tor strains using Real-Time PCR. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 2(1), 9–13.
- Gentile, A. et al. (2008). Impacto de la gastroenteritis por rotavirus en la Argentina. *Revista pediátrica del Hospital de Niños de Buenos Aires*, 50 (226).
- Gil, A., Miranda, H., Lanata, C., et al. (2007). O3:K6 serotype of *Vibrio parahaemolyticus* identical to the global pandemic clone associated with diarrhea in Perú. *International Journal of Infectious Diseases*, 11, 324-328.
- Gil, A., Lanata, C., Miranda, H., et al. (2007). Gravedad de la gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* del grupo pandémico en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 24, 350-355.
- González, S., Villagra, A., Pichelli, M., Figueroa, S., Merletti, G., Caffer, M., Cecilia, M., Binsztein, N. (2009). Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Revista Argentina de Microbiología*, 41, 11-19.
- González, N., Gavilán, R., Toro, M., Zamudio, M., Martínez, J. (2016). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Sequence Type 120, Peru, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1235-1237.
- Gunhild, J., Svennerholm, A., Holmgren, J. (1989). Expression and detection of different biotype associated cell-bound Haemagglutinins of *Vibrio cholerae* O1. *Journal of general microbiology*, 135, 111-120.
- Hall, G. y Woods, G. (2006). Chapter 56: Medical Bacteriology. McPherson, A. Richard, Pincus, R. (editors): Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21ava ed. *Saunders Elsevier: EE.UU*, 1034-1035.

- Heitmann, I., Jofré, L., Hormázabal, C., Olea, A., Vallebuona, C., Valdés, C. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista chilena de infectología*, 22(2), 131-140.
- Hernández, C., Ulloa, J., Vergara, J., Espejo, R., Cabello, F. (2005). Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. *Revista médica de Chile*, 133(2), 1081-1088.
- Hlady, W. y Klontz, K. (1996). The epidemiology of *Vibrio infections* in Florida, 1981-1993. *Journal of Infectious Diseases*, 173(5), 1176-1183.
- Huapaya, B., Padilla, C., Suárez, V. y Gavilán, R. (2005). Aislamiento de *Vibrio cholerae*O139 en el sur de lima, Perú, diciembre 2004. Boletín informativo del Instituto Nacional de Salud, 11, (01-02) enero – febrero.
- Huapaya, B. y Suárez, V. *Vibrio parahaemolyticus*. PERÚ 2005. (2005). Boletín informativo del Instituto Nacional de Salud, 11, (3-4) marzo – abril.
- Ibarra, J., Delgado, A. y Alvarado, D. (1999). Vibrios no epidémicos y *Vibrio cholerae* O1 Asociados a Enfermedad Diarreica Aguda. Evento Climatológico “El Niño” - 1998. Hospital Nacional Dos de Mayo. *Revista de investigación de la UNMSM*, 60, (4).
- Instituto Nacional de Salud. Infecciones por *Vibrio spp* después del huracán Katrina, en diferentes estados de Estados Unidos. (2005). Boletín informativo del Instituto Nacional de Salud, 11, (9-10) Setiembre-Octubre.
- Kabir, S. (2007). Cholera vaccines. *Lancet Infectious Diseases*, 7, 176-178.
- List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. 10 de junio del 2017. <http://www.bacterio.net/-copyright.html>
- Maguiña, C., Seas, C., Galán, E., Santana, J. (2010). Historia del cólera en el Perú en 1991. *Acta Médica Peruana*. 27(3), 212-217.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., et al. (2003). Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *Vibrio cholerae*. *The Lancet*, 361, 743-749.

- Mehrabadi, J. F., Morsali, P., Nejad, H. R. y Fooladi A. A. (2012). Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *Journal of Infection and Public Health*. 5, 263-267.
- Morris, J. (1994). Non-O group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. En: Wachsmuth K, Blake P, Olvick f. *Vibrio cholerae* and cholera molecular to global perspectives. Washington DC. *American Society for Microbiology Press*. 103-15.
- Morris, J. (2003). Cholera and Other Types of vibriosis: A Story of Human Pandemics and Oysters on the Half Shell. *Food Safety Education*, 37, 272–80.
- Nair, G., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S., Dutta, B., Takeda, Y. y Sack D. (2007). Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (1), 39-48.
- Namdari, H., Klaips, C., Hughes, J. (2000). A cytotoxin- producing strain of *Vibrio cholerae* non- O1, non- O139 as a cause of cholera and bacteremia after consumption of raw clams. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3518-3519.
- Nandi, B., Nandy, R., Mukhopadhyay, S., Nair, G., Shimada, T. y Ghose, A. (2000a). Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein *OmpW*. *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (11), 4145-4151.
- Nandi, B., Nandy, R. K., Vicente, A. C. P. y Ghose, A. C. (2000b). Molecular characterization of a new variant of toxin-coregulated pilus protein (*TcpA*) in a toxigenic non-O1/non-O139 strain of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*. 68 (2), 948-952.
- Neill, M. y Carpenter, C. (2005). Other Pathogenic Vibrios. en Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., (editors). Mandell, Douglas and Bennett's: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6a ed. (pp 2544-2546). Churchill Livingstone: Philadelphia.
- Organización Mundial de la Salud y Administración de Alimentos y Agricultura. (2001). Consulta mixta FAO/OMS de expertos sobre la valuación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en los alimentos. Identificación de los peligros, evaluación de exposición y caracterización de los peligros de *Campylobacter spp.* en pollos para

asar y *Vibrio spp.* en mariscos. Informe de la Oficina Central de la Organización Mundial de la Salud OMN. (pp 23-27); Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de la Salud. (2002). *Vibrio cholerae* en: Guías para la calidad del agua potable, 2ª ed. Microbiological agents in drinking water: Ginebra (Suiza), 119–142.

Organización Mundial de la Salud. (2005). Cholera, 2004. *The Weekly Epidemiological Record*, 80 (31), 261-268.

Organización Panamericana de la Salud. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. (1994). Edición en español, Programa especial de publicaciones de la Organización Panamericana de la Salud.

Reidl, J. y Klose, K. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2), 125-139.

Rivas, M., Cacace, M., Ayala, L., Baschkier, A., Miliwebsky, E., Caffer, M. (1996). Casos de gastroenteritis asociados a *Vibrio cholerae* no-01 en Orán, Salta. *Revista Argentina de Microbiología*; 28,163-9.

RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution, encontrado en:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_056069.pdf

Shimada, T., Arakawa, E., Kenichiro, I., Okitsu, T., Matsushima, A. (1994). Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology*, 28, 175-8.

Thompson, F., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), 403-31.

Ueno, H., Tomari, K., Kikuchi, K., Kobori, S. y Miyazaki, M. (2016). The First Report of *Vibrio parahaemolyticus* Strain O10:K60 in Japan, a New Combination of O and K Serotypes Isolated from a Patient with Gastroenteritis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 69, 28–32.

Valdez, O. et al. (2011). Diseño y aplicación de un método molecular para el diagnóstico del virus influenza A (H1N1) pandémico en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 63(1), 15-20.

Vibrio illnesses after Hurricane Katrina-multiple states, August-September. (2005).
Morbidity and Mortality Weekly Report, 54 (37), 928-31.

IX. ANEXOS

1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN PARA MUESTRAS CLÍNICAS DE LA VIGILANCIA MOLECULAR DE *Vibrio cholerae* Y *Vibrio parahaemolyticus* EN LA COSTA PERUANA EN EL PERIODO 2016 - 2017, INSTITUTO NACIONAL DE SALUD:

Los criterios a ser considerados en la presente vigilancia son:

Criterios de inclusión:

- Niños menores de cinco años con diarrea.
- Niños mayores de cinco años con diarrea.
- Jóvenes y adultos con diarreas.

Criterios de exclusión:

- Niños con diarrea aguda por otras etiologías.
- Pacientes con tratamiento con antibióticos

Definición de caso

Persona que presenta bruscamente un cuadro clínico de diarrea acuosa con o sin vómitos, con deshidratación severa o shock, y sin presencia de fiebre. Durante la vigilancia se pondrá énfasis en pacientes menores de 5 años con diarrea aguda al ser una población altamente vulnerable según la Norma técnica PNA 2010 del CENAN - INS.

Clasificación de casos

Las pruebas de laboratorio a usar en la presente vigilancia cuentan con Informe de Validación o Verificación aprobado por CNSP. “Protocolos de la Vigilancia Epidemiológica Parte I PERÚ/MINSA/OGE - 04/001”. Serie normas de vigilancia epidemiológica en salud pública – 2005.

- Caso sospechoso:

Persona de cualquier edad que presenta un cuadro de diarreas acuosas de aparición brusca que lleva rápidamente a la deshidratación.

- Caso Probable:

Persona de cualquier edad que presenta bruscamente un cuadro clínico de diarrea acuosa con o sin vómitos, con deshidratación severa o shock, y sin presencia de fiebre o Persona de cualquier edad que muere por un cuadro de enfermedad diarreica aguda acuosa.

2. EXTRACCIÓN DE ADN CON DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN).

Extracción a partir de cultivo celular.

Procedimiento:

1. Centrifugar un máximo de 5×10^6 células por 3 minutos a 7000rpm.
2. Resuspender el pellet en 200ul de PBS (homogenizar bien con la micropipeta).
3. Adicionar 20ul de proteinasa K.
4. Adicionar 200ul de buffer AL. Homogenizar con el vortex. Incubar las muestras a 56°C por 10 minutos.
5. Adicionar 200ul de Etanol absoluto (100%). Homogenizar con el vortex.
6. Colocar 600ul del homogenizado y verter una columna de spin que viene con su tubo colector. Centrifugar a 8000rpm por 1 minuto. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
7. Colocar la columna de spin sobre un nuevo tubo colector.
8. Adicionar 500ul de buffer AW₁. Centrifugar por 1 minuto a 8000rpm. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
9. Colocar la columna de spin en un nuevo tubo colector.
10. Adicionar 500ul de buffer AW₂, centrifugar por 3 minutos a 14000rpm. Descartar el sobrenadante y el tubo colector.
11. Transferir la columna de spin a un tubo de microcentrifuga (eppendorf de 1.5ml).
12. Eluir el DNA adicionando 200ul de buffer AE al centro de la membrana de la columna de spin.
13. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
14. Centrifugar por 1 minuto a 10000rpm.
15. De manera opcional repetir nuevamente la elución agregando a la columna 150ul de buffer AE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar a 10000rpm por 1 minuto.

3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN/PURIFICACIÓN DE DNA TOTAL A PARTIR DE HECES CONSERVADAS EN *RNAlater* PARA LA DETECCIÓN DE *Vibrio spp.* (MODIFICACIÓN DEL KIT QIAAMP® FAST DNA STOOL MINI- QIAGEN):

El proceso de centrifugación se llevó a cabo a 14, 000 RPM.

1. Para heces conservados en *RNAlater*, centrifugar a 14, 000 RPM por 5 minutos y descartar el sobrenadante. Luego, lavar las heces con PBS o agua PCR (x2).
2. Adicionar sólo 300 ul de la muestra a un tubo *eppendorf*, localizado sobre hielo, e inmediatamente añadir 1ml del buffer InhibitEX. Se recomienda, previamente, homogenizar bien la muestra con un *tip* de 1000ul ligeramente cortado en la punta con un bisturí o tijera estéril, para evitar obstrucciones durante el homogenizado. Luego, seguir el paso 3.
3. Homogenizar vigorosamente las muestras en el vortex por un periodo total de 30 minutos.
4. Incubar la suspensión a 70°C por 15 min. Vortex por 15 s.
5. Centrifugar la muestra a máxima velocidad por 1 min. No transferir ningún material sólido. En caso exista partículas visibles en el sobrenadante, centrifugar de nuevo.
6. Añadir 15 ul de proteinasa K dentro de un tubo *eppendorf*. Seguidamente, adicionar 200 ul del sobrenadante obtenido en el paso 5, hacía el tubo conteniendo la proteinasa K.
7. Luego, añadir 200 µl de Buffer AL y vortex por 15 s.
8. Incubar a 70°C por 10 min.
9. Adicionar al lisado 200 µl de etanol (100%) y mezclar en el vortex por 15 segundos.
10. Con mucho cuidado transferir 600 ul del lisado obtenido en el paso 9 hacía una columna spin QIAamp dentro de un tubo colector. Luego, centrifuga a velocidad máxima por 1min.
11. Seguidamente, descarta el filtrado y localiza la columna en un nuevo tubo colector.
12. Adiciona 500 µl Buffer AW1 y centrifuga a velocidad máxima por 1 min.

13. Seguidamente, descarta el filtrado y localiza la columna en un nuevo tubo colector.
14. Adiciona 500 µl Buffer AW2 y centrifuga a velocidad máxima por 3 min.
15. Transfiere la columna spin QIAamp dentro un tubo eppendorf y adiciona 200ul de Buffer ATE en el centro de la membrana. Incuba por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifuga a velocidad máxima por 1 min.

4. PROTOCOLOS DE PCR PARA EL GEN *ToxR* DE *Vibrio parahaemolyticus*:

Protocolo de PCR para detectar el gen *ToxR* de *V. parahaemolyticus*

Gen: Proteína ToxR

Vol. de reacción:

Abrev. *ToxR*

25ul / tubo

Pb. 368

Primers:

Secuencia de Oligonucleótidos

ToxR4-F 5'- GTCTTCTGACGCAATCGTTG – 3'

ToxR7-R 5'- ATACGAGTGGTTGCTGTCATG – 3'

N° de Ciclos 20				
Activación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Elongación
96°C	94°C	63°C	72°C	72°C
5 min	1 min	90 sec	90 sec	7 min

MASTER MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X
Buffer	10X	1	2.5
MgCl ₂	50 mM	2	1
dNTP's	10 mM	0.2	0.5
ToxR4-F	10 uM	0.4	1
ToxR7-R	10 uM	0.4	1
TaqDNA Polymerasa	5 unids/ul	0.025	0.125
ADN			3
ddH ₂ O			15.875
Volumen total			25ul

5. PROTOCOLOS DE PCR PARA EL GEN *tdh* DE *Vibrio parahaemolyticus*:

Protocolo de PCR para detectar el gen *tdh* de *V. parahaemolyticus*

Gen: Hemolisina Termoestable Directa

Vol. de reacción:

Abrev. *tdh*

25ul / tubo

Pb. 252

Primers:

Secuencia de Oligonucleótidos

tdhT-F 5' - CCACTACCACTCTCATATGC – 3'

tdhT-R 5' - GGTAATAAATGGCTGACATC – 3'

N° de Ciclos 35				
Activación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Elongación
96°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5 min	1 min	1 min	1 min	7 min

MASTER MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X
Buffer	10X	1	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5	0.75
dNTP's	10 mM	0.4	1
ToxR4-F	20 uM	0.4	0.5
ToxR7-R	20 uM	0.4	0.5
TaqDNA Polymerasa	5 unids/ul	1.25	0.25
ADN			3
ddH ₂ O			16.5
Volumen total			25ul

6. PROTOCOLOS DE PCR PARA EL GEN *trh* DE *Vibrio parahaemolyticus*:

Protocolo de PCR para detectar el gen *trh* de *V. parahaemolyticus*

Gen: Hemolisina Relacionada con TDH

Vol. de reacción:

Abrev. *trh*

25ul / tubo

Pb. 250

Primers:

Secuencia de Oligonucleótidos

trh-R2 5'- GGCTCAAAATGGTTAAGCG – 3'

trh-R6 5' - CATTTCGCTCTCATATGC – 3'

N° de Ciclos 35				
Activación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Elongación
96°C	94°C	55°C	72°C	72°C
5 min	1 min	1 min	1 min	7 min

MASTER MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X
Buffer	10X	1	2.5
MgCl ₂	50 mM	1.5	0.75
dNTP's	10 mM	0.8	0.2
ToxR4-F	20 uM	0.4	0.5
ToxR7-R	20 uM	0.4	0.5
TaqDNA Polymerasa	5 unids/ul	1.25	0.25
ADN			3
ddH ₂ O			15.5
Volumen total			25ul

7. PROTOCOLOS DE PCR PARA EL GEN *OmpW* DE *Vibrio cholerae*:

Protocolo de PCR para detectar el gen *OmpW* de *V. cholerae*

Gen: Lipoproteína de membrana externa Vol. de reacción:
 Abrev. *OmpW* 25ul / tubo
 Pb. 304

Primers: Secuencia de Oligonucleótidos
 OmpW-F 5' - CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG – 3'
 OmpW-R 5' - GGTTTGTCGAATTAGCTTCAC – 3'

N° de Ciclos 30				
Activación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Elongación
94°C	94°C	64°C	72°C	72°C
5 min.	30 s.	30 s.	1 min.	3 min.

MASTER MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X
Buffer	10X	1	2.5
MgCl ₂	50 mM	3	1.5
dNTP's	10 mM	1	2.5
ToxR4-F	20 uM	1	1.25
ToxR7-R	20 uM	1	1.25
TaqDNA Polymerasa	5 unids/ul	0.06	0.3
ADN			3
ddH ₂ O			12.7
Volumen total			25ul

8. PROTOCOLOS DE PCR PARA EL GEN *ctxA* DE *Vibrio cholerae*:

Protocolo de PCR para detectar el gen *ctxA* de *V. cholerae*

Gen: Subunidad A de la enterotoxina colérica Vol. de reacción:
 Abrev. *ctxA* 25ul / tubo
 Pb. 219

Primers: Secuencia de Oligonucleótidos
 ctxA-F 5'- GGTCTTATGCCAGAGGACAG – 3'
 ctxA-R 5' - GTTGGGTGCAGTGGCTATAAC – 3'

N° de Ciclos 30				
Activación	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Elongación
96°C	94°C	50°C	72°C	72°C
4 min	1 min	1 min	1 min	5 min

MASTER MIX

Componentes	Stock []	Final []	1X
Buffer	10X	1	2.5
MgCl ₂	50 mM	2	1
0dNTP's	10 mM	0.8	2
ToxR4-F	10 uM	1	2.5
ToxR7-R	10 uM	1	2.5
TaqDNA Polymerasa	5 unids/ul	0.025	0.125
ADN			3
ddH ₂ O			12.25
Volumen total			25ul

9. PROTOCOLO *V. parahaemolyticus* *tdh-trh* MULTIPLEX PCR TIEMPO REAL:

Patógeno: *Vibrio parahaemolyticus*

Loci: *tdh* y *trh*.

Origen/procedencia: Muestras clínicas o ambientales

Tabla 1. Mix multiplex PCR tiempo real para *Vibrio parahaemolyticus*.

Componentes	Unids	Final []	Volumen (μL)
Buffer	X	1	2.5
MgCl ₂	mM	1.5	0.75
dNTP's	mM	0.2	2.5
Mix primers	uM		2
Taq	unids/ul	2	0.1
ddH ₂ O			15.15
Template			2
Total			25

Tabla 2. Primers mix.

Primers	C (nM)	100μM Stock (ul)
<i>tdh forward</i>	200	5
<i>tdh reverse</i>	200	5
<i>tdh probe</i>	75	1.88
<i>trh forward</i>	200	5
<i>trh reverse</i>	200	5
<i>trh probe</i>	75	1.88
Agua ultrapura		176.24
V total		200

Tabla 3. PCR cycling conditions

Step	Temp.	Duration	Cycles
EA	94°C	2 min	Hold
Denaturation	95°C	5 sec	45
A/E	59°C	45 sec	

Tabla 4. Assay Interpretation

Channel	Target	Fluorophore	Quencher
RED	tdh	Cy5	BHQ-3
YELLOW	trh	HEX	BHQ-2

10. PROTOCOLO *V. cholerae* *ctxA* MULTIPLEX PCR TIEMPO REAL:

PROTOCOLO *Vc-ctxA* PCR TIEMPO REAL TOXIGÉNICOS para *Vibrio cholerae*

Patógeno: *Vibrio cholerae* toxigénicos

Loci: *ctxA* (85 bp)

Fuente: Muestras Clínicas o ambientales

Tabla 1. Mix multiplex real time PCR for *Vibrio cholerae*.

Components	Unids	[]	Volumen (μL)
Buffer	X	10	2.5
MgCl ₂	mM	50	2.5
dNTP's	mM	10	0.5
Primer forward	uM	10	6.25
Primer reverse		10	6.25
Probe		10	0.25
Taq	unids/ul	5	0.25
ddH ₂ O			14.750
Template			3
Total			25

Tabla 2. Condiciones de ciclaje para la PCR.

Step	Temp.	Duration	Cycles
EA	94°C	2 min	Hold
Denaturation	94°C	10 sec	45
A/E	63°C	30 sec	

11. FORMULAS PARA HALLAR LA SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VPP Y VPN

11.1. Sensibilidad:

$$Sensibilidad = \frac{VP}{VP + FN}$$

donde VP es verdaderos positivos y FN falsos negativos.

11.2. Especificidad:

$$Especificidad = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde **VN**, serían los verdaderos negativos; y **FP**, los falsos positivos.

11.3. Valor predictivo positivo (VPP):

$$(PV+) = \frac{\text{Resultados positivos en enfermos}}{\text{Total de resultados positivos}} = \frac{VP}{FP + VP}$$

11.4. Valor predictivo negativo (VPN):

$$(PV-) = \frac{\text{Resultados negativos en sanos}}{\text{Total de resultados negativos}} = \frac{VN}{VN + FN}$$

12. LISTA DE PRIMERS Y SONDAS PARA PROTOCOLOS DE PCR tiempo real y PCR convencional:

Nombre	Secuencia	Escala	Modificación	Gen
PCR tiempo real				
ctxA_F	TTTGTTAGGCACGATGATGGAT	0.2 uM		ctxA
ctxA_R	ACCAGACAATATAGTTTGACCCACTAAG	0.2 uM		
ctxA_P	TGTTTCCACCTCAATTAGTTTGAGAAGTGCCC	0.2 uM	FAM – BHQ1	
tdh_F1	TCCCTTTTCCTGCCCCC	0.2 uM		tdh
tdh_R1	CGCTGCCATTGTATAGTCTTTATC	0.2 uM		
tdh_P1	TGACATCCTACATGACTGTG	0.2 uM	CY5– BHQ2	
trh_F2	TTGCTTTCAGTTTGCTATTGGCT	0.2 uM		trh
trh_R2	TGTTTACCGTCATATAGGCGCTT	0.2 uM		
trh_P2	AGAAATACAACAATCAAACTGA	0.2 uM	HEX– BHQ2	
PCR convencional				
ToxR4-F	GTCTTCTGACGCAATCGTTG	0.4 uM		toxR
ToxR7-R	ATACGAGTGGTTGCTGTCATG	0.4 uM		
tdhT-F	CCACTACCACTCTCATATGC	0.4 uM		tdh
tdhT-R	GGTACTAAATGGCTGACATC	0.4 uM		
trh-R2	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	0.4 uM		trh
trh-R6	CATTTCCGCTCTCATATGC	0.4 uM		
OmpW-F	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGTG	1 uM		ompW
OmpW-R	GGTTTGTCGAATTAGCTTCAC	1 uM		
ctxA-F	GGTCTTATGCCAGAGGACAG	1 uM		ctxA
ctxA-R	GTTGGGTGCAGTGGCTATAAC	1 uM		

13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE GENES EVALUADOS EN *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*:

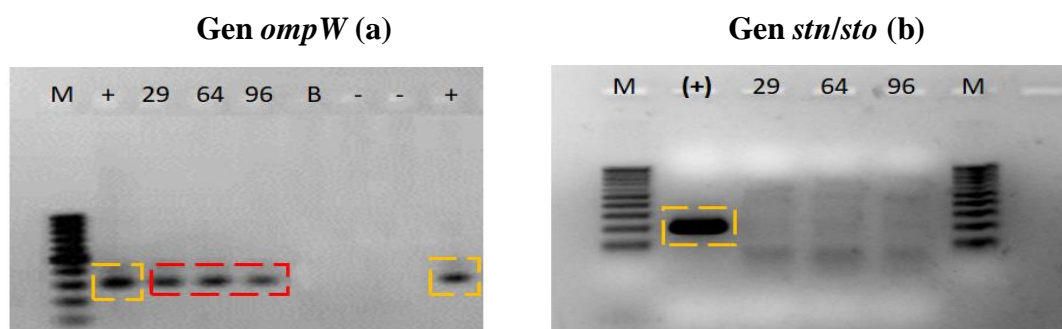


Figura 13.1: (a) Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen *ompW* (304pb) de *V. cholerae* de ADN extraído de cepas. (b) Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen *stn/sto* (216pb) de *V. cholerae* de ADN extraído de cepas.

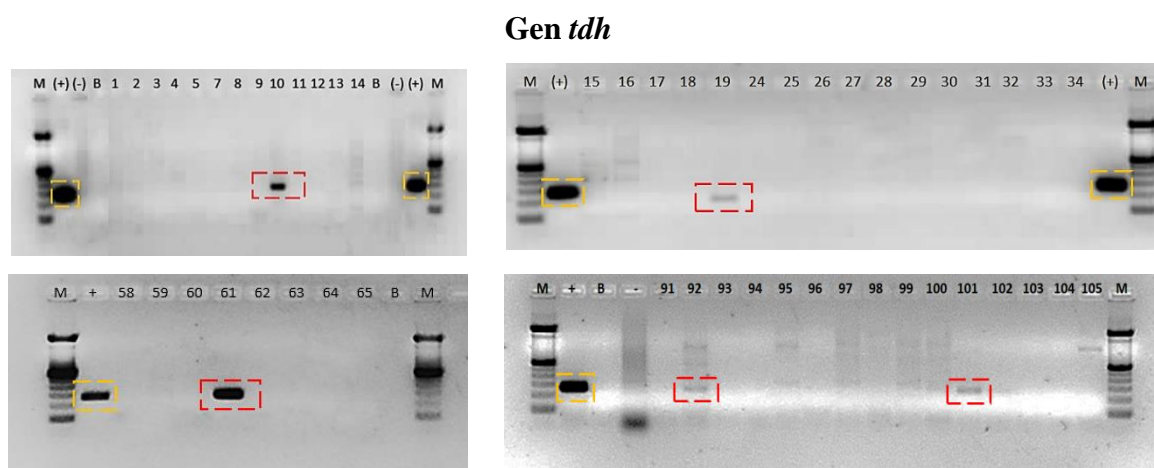


Figura 13.2: Electroforesis de productos de la PCR convencional amplificando el gen *tdh* (252pb) de *V. parahaemolyticus* de ADN extraído directo de heces.

14. FIGURAS

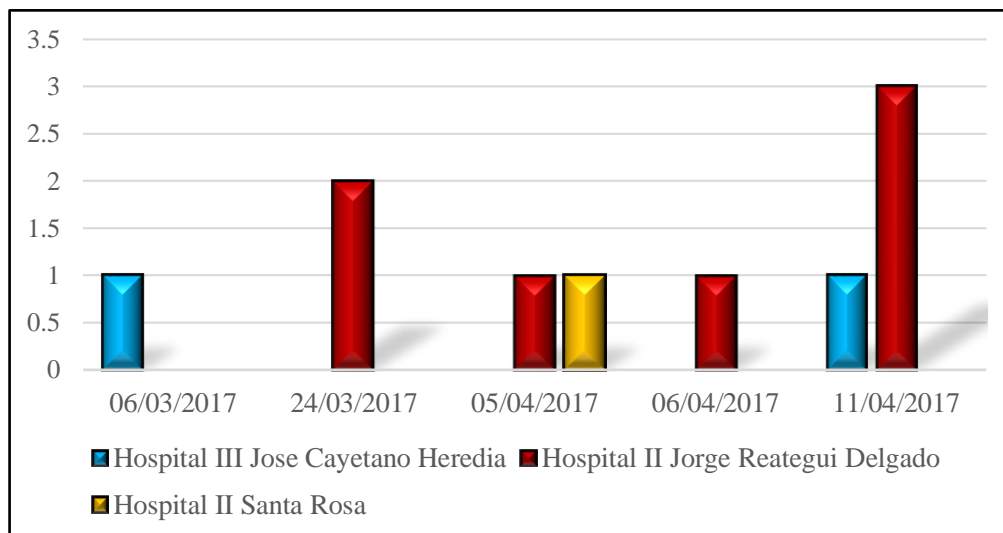


Figura 14.1: Fechas de recolección de muestras positivas para el gen *tdh* de *V. parahaemolyticus* por cada hospital.

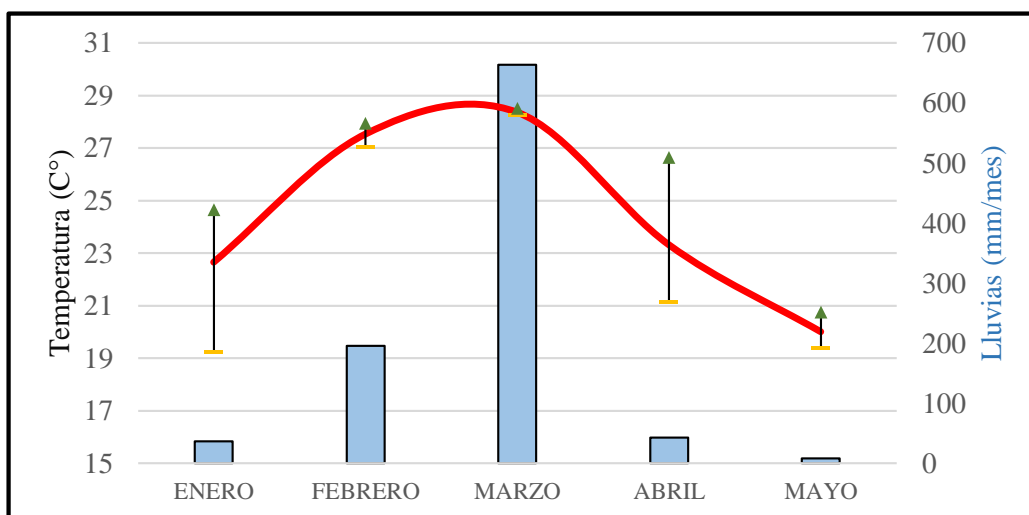


Figura 14.2: Temperatura y precipitación durante enero – mayo 2017. ▲: Máxima temperatura superficial del mar, — : Mínima temperatura superficial del mar, — : Promedio de temperaturas superficiales del mar, ■ : Valor de precipitación.



Figura 14.3: Medios TCBS, CHROMagar Vibrio 1% NaCl y agar SS.



Figura 14.4: Muestras de heces recolectadas de los centros de salud de Piura.

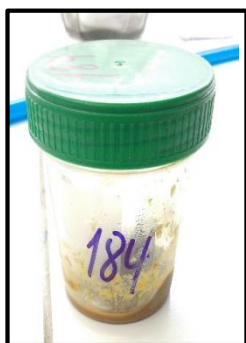


Figura 14.5: Muestras de heces recolectadas de los centros de salud de Piura.



Figura 14.6: Muestras de heces recolectadas de los centros de salud de Piura.



Figura 14.7: Enriquecimiento de las muestras de heces en APA 1% NaCl.



Figura 14.8: Muestras de heces conservadas en ARNlater.